Aus der WE Klinische Pharmakologie
im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
(Direktor: Professor Dr. med. H. Kewitz)

Untersuchungen über den Stoffwechsel des Lipidcholins in der Skelettmuskulatur der Ratte und seine Beeinflussung durch Phenobarbital

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Thomas Schwartzkopff
Berlin

1975

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547206_0030

Aus der WE Klinische Pharmakologie
im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
(Direktor: Professor Dr. med. H. Kewitz)

Untersuchungen über den Stoffwechsel des Lipidcholins in der Skelettmuskulatur der Ratte und seine Beeinflussung durch Phenobarbital

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Thomas Schwartzkopff
Berlin

Referent: Prof. Dr. med. H. Kewitz

Korreferent: Prof. Dr. F. von Bruchhausen

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 5. 9. 1975

Inhaltsangabe Seite

I. Einleitung 5

II. Material und Methoden 13
1) Tiere 13
2) Verwendete Chemikalien 13
3) Radioaktive Substanzen 13
4) Gewinnung und Extraktion der Organe 14
5) Isolierung der wasserlöslichen Verbindungen Fettextraktion 14
6) Papierchromatografie 15
7) Isolierung des Lipidcholin 16
8) Ionenpaarextraktion 17
9) Bestimmung der Cholinkonzentration 18
10) Messung der Radioaktivität 18
11) Phenobarbital-Vorbehandlung 19
12) Statistische Auswertung 19

III. Ergebnisse 20
1) Die Konzentrationen im Blut und der Skelettmuskulatur sowie deren Beeinflussung durch Phenobarbital 20
a) Cholin im Blut
b) Cholin, Phosphorylcholin, Lipidcholin und Glycerylphosphorylcholin in der Skelettmuskulatur
2) Einbau von radioaktiv markiertem Cholin in die Bausteine des Lipidcholinstoffwechsels des Skelettmuskels 20
3) Der Einfluß von Phenobarbital auf den Einbau von Cholin 22
4) Einbau von Radioaktivität aus Cholin, das in der Kette markiert ist 30
5) Der Einbau von Methionin (^{3}H-Methyl) in die Bausteine des Lipidcholinstoffwechsels von Leber und Muskel 30

Seite

6) Der Einfluß von Phenobarbital auf den Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat in das Phosphorylcholin, die Gesamtphospholipide und das Lezithin des Skelettmuskels 35

IV. Diskussion 39

V. Zusammenfassung 45

VI. Literaturverzeichnis 48

I. Einleitung

Phospholipide sind Bausteine biologischer Membranen. Der Menge nach überwiegen in tierischen Geweben die Lezithine und die Kephaline gegenüber den Plasmalogenen, den Sphingomyelinen, den Inositphospatiden und anderen in noch geringerer Konzentration vorkommenden.

Lange Zeit war angenommen worden, daß die Phospholipide nur zur Aufrechterhaltung der Struktur dienen und daher einen sehr trägen Stoffwechsel hätten.

Diese Anschauung änderte sich als Untersuchungen mit radioaktiven Isotopen eingeführt wurden (1). 1937 erschienen die ersten Arbeiten über den Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat in die Phospholipide erwachsener Tiere (2, 3, 4). Die Ergebnisse zeigten, daß die aus den Geweben isolierten Phospholipide schon nach kurzer Inkorporationszeit radioaktiven Phosphor zu einem erheblichen Teil enthielten. Dies deutete auf einen verhältnismäßig raschen Stoffwechsel hin.

Seit mehr als 10 Jahren sind die enzymatischen Schritte der Synthese und des Abbaus zum großen Teil aufgeklärt. Die Beeinflussung des Stoffwechsels der Phospholipide durch Pharmaka ist jedoch noch wenig untersucht.

Die vorliegende Arbeit stellt eine Studie des Umsatzes cholinhaltiger Phospholipide in der Muskulatur unbehandelter und mit Phenobarbital vorbehandelter Ratten dar. Phenobarbital wurde gewählt, weil dieser Stoff zu den Pharmaka gehört, die in der Leberzelle eine Vermehrung des endoplasmatischen Retikulums und gleichzeitig eine Zunahme von Enzymen bewirkt, die am Umbau von Arzneimitteln beteiligt sind (5, 6).

Bei Untersuchungen über den Lipidstoffwechsel während der Enzyminduktion und Membranvermehrung in der Leber ergaben

sich Hinweise darauf, daß die mehrtägige Behandlung mit Phenobarbital auch in der Skelettmuskulatur zu Veränderungen des Phospholipid-Stoffwechsels führen könnte.

Nach i. v.-Injektion von radiomarkiertem Cholin fand sich nämlich bei Tieren, die mit Phenobarbital vorbehandelt waren, im freien Cholin der Leber 30 % weniger Radioaktivität als bei den unbehandelten Kontrolltieren (7). Ursache dafür war eine verminderte spezifische Radioaktivität im freien Cholin des Blutes, das heißt ein rascheres Verschwinden des injizierten radiomarkierten Cholins aus dem Blut. Die Vermutung lag nahe, daß diese Veränderung durch eine vermehrte Aufnahme in die Muskulatur bedingt sein könnte.

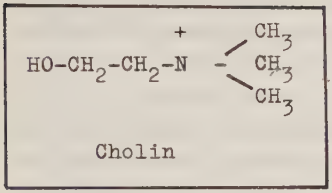
Um diese Frage zu klären, wurden a) der Einbau von markiertem Cholin, b) die Inkorporation von markierten Methylgruppen aus Methionin und c) der Einbau von PO_4--- in die Phospholipide und ihre Stoffwechselprodukte studiert.

Etwa 60 % der Phospholipidmenge in der Muskulatur bestehen aus Lezithin (8). Es besteht aus 1 Mol Glycerin, 2 Mol Fettsäure, 1 Mol Phosphorsäure und 1 Mol Cholin. Eine der primären und die sekundäre Alkoholgruppe des Glycerins sind mit Fettsäuren verestert, die zweite primäre Alkoholgruppe dagegen ist mit Phosphorsäure verestert, die über eine zweite Esterbindung Cholin trägt (Zeichnung Nr. 1).

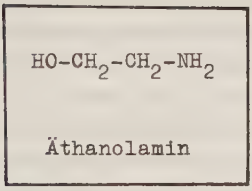
Stehen Äthanolamin oder Serin an der Stelle des Cholins, werden die entsprechenden Verbindungen als Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylserin bezeichnet. Man nannte sie früher auch Kephaline.

Sphingomyelin, Lysolezithin und Plasmalogene sind weitere Phospholipidfraktionen,an deren Aufbau Cholin beteiligt ist. Sie sind jedoch im Vergleich zum Lezithin in wesentlich geringeren Mengen vorhanden.

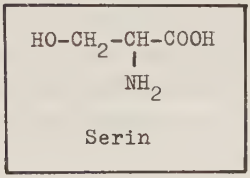
Zeichnung Nr. 1



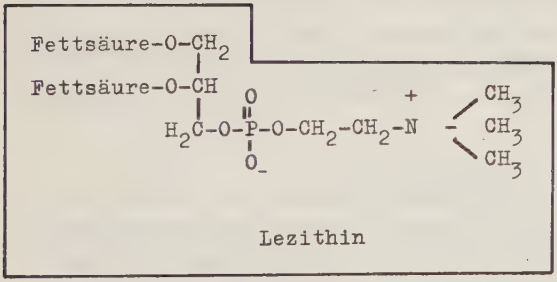
Cholin



Äthanolamin



Serin



Lezithin

Nach Injektion von radiomarkiertem Cholin oder an der Methylgruppe markiertem Methionin findet sich die in den Gesamtphospholipiden gemessene Radioaktivität zu über 90 % in der Lezithinfraktion wieder (9).

Als Syntheseweg kommt erstens der von Kennedy und Weiss (10) beschriebene Weg in Frage (Zeichnung Nr. 2). Nach den Ergebnissen verschiedener Experimente in vitro (10) und in vivo (9, 11) erfolgt hierbei der Einbau von freiem Cholin in das Lezithin über folgende Stoffwechselprodukte: zuerst reagiert es mit ATP zu Phosphorylcholin und ADP. Im zweiten Schritt entsteht aus Phosphorylcholin und Cytidintriphosphat Pyrophosphat und Cytidindiphosphatcholin. Zum Schluß wird das Phosphorylcholin vom CDP-Cholin auf ein Diglycerid übertragen,und dadurch entsteht Lezithin.

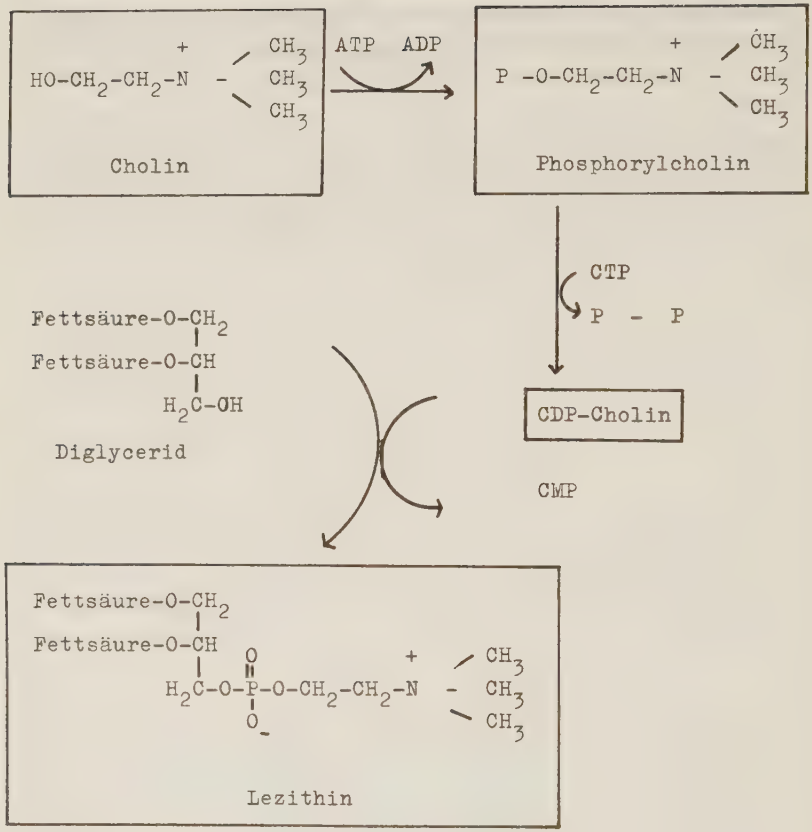
Zweitens kann Lezithin durch schrittweise N-Methylierung von Phosphatidyläthanolamin entstehen. Metylgruppendonator ist hierbei das S-Adenosylmethionin. Diese N-Methylierung von Phosphatidyläthanolamin ist bisher eindeutig nur in der Leber nachgewiesen worden (12, 13, 14, 15, 16), (Zeichnung Nr. 3).

Drittens kann Lezithin durch Acylierung von Lysolezithin entstehen, indem eine Fettsäure entweder von acyliertem CoA (17) oder aus einem zweiten Lysolezithinmolekül übertragen wird (Zeichnung Nr. 4). Die Entstehung von Lezithin aus 2 Mol Lysolezithin ist erst durch Befunde von Illingworth und Portman sowie von Porcellati, die in den letzten Jahren erhoben wurden, nachgewiesen worden (18, 19). Hierbei ist bemerkenswert, daß auf dem Blutweg transportiertes Lysolezithin in die Organzellen eindringen und dort zu Lezithin umgewandelt werden kann.

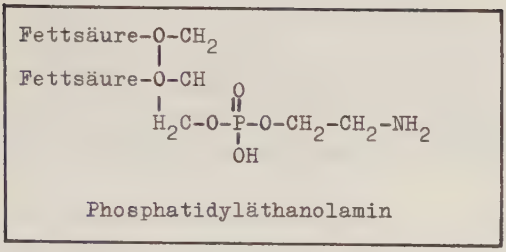
Der vierte Weg, über den radiomarkiertes Cholin in das Lezithin gelangt, ist der von Dils und Hübscher (1961) in

vitro entdeckte Basenaustausch, das heißt ein Austausch zwischen freien Basen und den in den Phospholipiden gebundenen (20). Kürzlich wurde von K. S. Bjerve gezeigt (21), daß der Austausch nicht nur mit den gleichartigen Basen erfolgt, sondern auch mit anderen. Z. B. kann Cholin an die Stelle von Äthanolamin oder Serin ins Phospholipid treten, und auf diese Weise Lezithin entstehen. Beim Austausch von freiem Cholin mit dem im Lezithin gebundenen Cholin würde dagegen keine Nettosynthese stattfinden.

Zeichnung Nr. 2



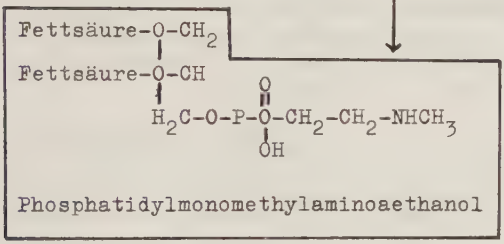
Zeichnung Nr. 3



Phosphatidyläthanolamin

+ S-Adenosylmethionin

S-Adenosylhomocystein



Phosphatidylmonomethylaminoaethanol

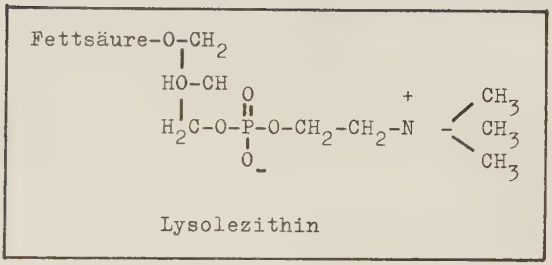
Phosphatidylmonomethylaminoaethanol + S-Adenosylmethionin ⟶

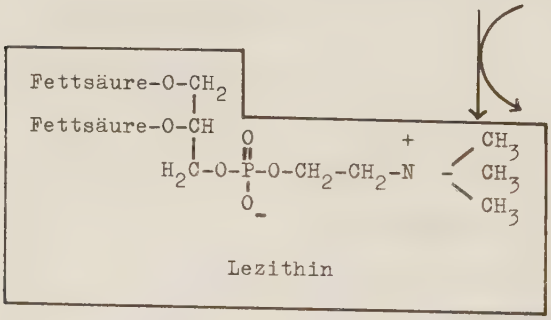
Phosphatidyldimethylaminoaethanol + S-Adenosylhomocystein

Phosphatidyldimethylaminoaethanol + S-Adenosylmethionin ⟶

Lezithin + S-Adenosylhomocystein

Zeichnung Nr. 4

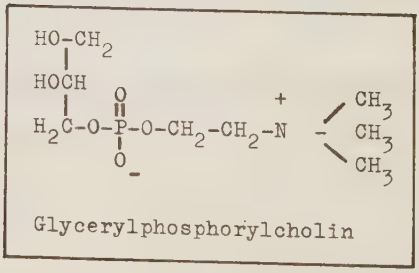




- - - - - - - - -

Lysolezithin + Lysolezithin

Lezithin



II. Material und Methoden

1) Tiere

Verwendet wurden von der Firma Mus-Rattus bezogene männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht von 120 bis 150 g. Die Tiere entstammten einer SPF-Zucht, das heißt sie waren frei von für Ratten pathogenen Mikroorganismen.

Als Futter dienten Pellets der Fa. Altromin GmbH und Leitungswasser ad libitum.

2) Verwendete Chemikalien

Alle für die Versuche verwendeten Chemikalien trugen die Bezeichnung "reinst" oder "pro analysi".

3) Radioaktive Substanzen

Folgende radioaktive Verbindungen wurden verwendet:
Cholinchlorid (Methyl-^{14}C), spezifische Aktivität: 59 mCi/mMol, geliefert vom Radiochemical Centre in Amersham, England.

Cholinchlorid (-1,2-^{14}C), spezifische Aktivität: 2 mCi/mMol, geliefert von NEN in England.

L-Methionin (Methyl-^{3}H), spezifische Aktivität: 8,2 Ci/mMol, geliefert vom Radiochemical Centre in Amersham, England.

Na H_2 $^{32}PO_4$, spezifische Aktivität: 1000 mCi/mMol, geliefert von NEN in England.

Die Substanzen wurden in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Pro 100 g Ratte wurden 0,2 ml der Lösung in die Schwanzvene injiziert. In 0,2 ml waren jeweils enthalten: 12 µCi Cholinchlorid (Methyl-^{14}C), 3 µCi Cholinchlorid (-1,2-^{14}C), 69 µCi L-Methionin (Methyl-^{3}H) und 160 µCi Na H_2 $^{32}PO_4$.

4) Gewinnung und Extraktion der Organe

Die Tiere wurden durch Dekapitation getötet, das Blut in 20 ml eiskaltem Äthanol (67 %) gesammelt und ca. 5 Sekunden mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Etwa 2-3 g Muskel aus beiden Mm. gastrocnemii wurden von sichtbarem Fett und Bindegewebe befreit und mit einem Skalpell möglichst fein zerkleinert.

Von der Leber wurden ebenfalls 2-3 g entnommen.

Sollten die wasserlöslichen Verbindungen untersucht werden, so wurden entsprechend den Angaben von Bjørnstad und Bremer (9) die Organteile in 20 ml eiskaltem, 67 % Äthanol mit dem Ultra-Turrax etwa 30 Sekunden lang homogenisiert.

Sollte das Lipidcholin bestimmt werden, so wurden die Gewebe nach der Methode von Folch, Lees und Stanley (22) in 20 ml Chloroform/Methanol (2 : 1 V/V) etwa 30 Sekunden lang homogenisiert. Sämtliche Homogenate wurden 30 Minuten geschüttelt und dann 10 Minuten bei 3000 U/Min. zentrifugiert.

Ein Aliquot wurde dem klaren Überstand entnommen und dieses dann bei 70° C im Wasserbad eingedampft.

5) Isolierung der wasserlöslichen Verbindungen
Fettextraktion

Zur Trennung der Lipide von den wasserlöslichen Verbindungen wurde nach den Angaben von Dross und Kewitz (23) verfahren. Die Proben wurden mit 2 ml H_2O aufgenommen, 15 ml Heptan/Amylalkohol (2 : 1 V/V) hinzugegeben, 10 Minuten geschüttelt und zur Phasentrennung kurz zentrifugiert. Die lipophile obere Phase wurde abgesaugt und verworfen.

Dieser Vorgang wurde insgesamt je 2 x mit je 15 ml Heptan/ Amylalkohol (2 : 1 V/V) und je 2 x mit Äther durchgeführt. Die verbliebene wässrige Phase wurde dann eingetrocknet, in 2 ml Methanol gelöst und ein Aliquot zu weiteren Chromatografie verwendet.

6) Papierchromatografie

Die Auftrennung erfolgte in der von Kewitz (24) angegebenen Weise. Im absteigenden System wurde auf Papier der Fa. Schleicher und Schüll Nr. 2043 b mgl x mit zwei aufeinander folgenden Lösungsmittelgemischen wie folgt chromatografiert:

1. n-Propanol/0,2 m Ammoniumacetat (4 : 1, V/V) über 20 h
2. n-Butanol/n-Propanol/98 % Äthanol/Ameisensäure/H_2O (6 : 2 : 1 : 1 : 2, V/V) über 16 h.

Zur Lokalisation der zu trennenden Substanzen wurde an den Seiten eines jeden Bogens Cholinchlorid, Phosphorylcholin (als Ca^{++} Salz), Betain und Glycerylphosphorylcholinchlorid aufgetragen und nach erfolgter Chromatografie mit Dragendorff's Reagenz angefärbt. Die Bahnen der zu trennenden Proben wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Cholin ließ sich so von den anderen Verbindungen trennen. Die Papierstreifen wurden mit Wasser 4 h eluiert und die Proben dann bei 70^{o} C im Wasserbad eingetrocknet.

Zum Ausschluß einer trotz Chromatografie noch verbleibenden Verunreinigung des so isolierten Cholins wurde zur weiteren Reinigung eine Ionenpaarextraktion durchgeführt (s. u.).

PC und GPC konnten papierchromatographisch nicht einwandfrei getrennt werden und wurden deshalb gemeinsam mit

1 N HCl eluiert. In 1 N HCl wird GPC bei 100° C sehr schnell vollständig hydrolisiert, PC dagegen bleibt vollständig erhalten. Mit Hilfe einer erneuten Chromatografie kann der Cholinanteil des GPC vom PC isoliert und nach erfolgter Ionenpaarextraktion bestimmt werden (s. u.).

Das PC wurde erneut mit Wasser eluiert und dann mit saurer Phosphatase hydrolysiert. Die Proben wurden hierzu mit 2 mg/ml saurer Phosphatase (Biochemica Boehringer) in Acetat Puffer bei pH 5,6 bei 37° C 90 Minuten im Wasserbad inkubiert (23). Hiernach erfolgte die Ionenpaarextraktion und Bestimmung (s. u.).

Bei den Untersuchungen, in denen ^{32}P in Form von Phosphat als Precursor appliziert worden war, mußten vor der Messung der Radioaktivität im PC sämtliche anderen phosphathaltigen Verbindungen abgetrennt werden. Hierzu wurde die nach Trennung der Lipide verbleibende wässrige Phase auf 5 ml Wasser aufgefüllt und jede Probe mit 30 mg Norit A 10 Minuten lang geschüttelt (25). Nach Zentrifugation wurde ein Aliquot vom Überstand abgenommen und im absteigenden System mit folgendem Lösungsmittelgemisch (26) chromatografiert: Methanol/NH_3 10 proz./Trichloressigsäure 10 proz./H_2O (50 : 15 : 5 : 30, V : V) über 16 h. Es gelang so, PC, GPC und anorganisches Phosphat zu trennen.

7) Isolierung des Lipidcholin

Die Isolierung der Lipide erfolgte in Anlehnung an die von Folch und Mitarbeitern beschriebene Methode (22).

Die eingetrockneten Proben wurden in 20 ml Chloroform/Methanol (2 : 1, V : V) gelöst, 4 ml 0,9 % Na Cl-Lösung hinzugegeben und auf 40° C erwärmt (5 Minuten). Dann wurde geschüttelt (10 Minuten), zentrifugiert (5 Minuten), die

wässrige obere Phase abgesaugt und verworfen. Anschließend wurde noch 3 x mit je 8 ml eines Gemisches von Chloroform/Methanol/0,9 % Na Cl (3 : 48 : 47, V : V) ausgeschüttelt und die Lipidphase eingetrocknet. Da das Lipidcholin als Cholin bestimmt werden soll, müssen die Lipide hydrolysiert werden. Dies erfolgte, indem die Proben in 20 ml 1N äthanolischer NaOH aufgenommen wurden und 16 h bei Zimmertemperatur stehen blieben. Danach wurde jeder Probe 50 µl Methylrot 0,1 % zugesetzt und mit rauchender HCl bis zur Rosafärbung titriert. Nach kurzem Zentrifugieren konnte der Überstand abgenommen und der Rückstand (NaCl) mit 20 ml Äthanol nachgewaschen werden. Die vereinigten Überstände wurden eingetrocknet und in 2 ml H_2O gelöst. Daran schloß sich die unter II, 5) bereits beschriebene Fettextraktion an.

Die wasserlöslichen Verbindungen wurden chromatografisch aufgetrennt (s. o.), das Cholin eluiert, durch Ionenpaarextraktion gereinigt (s. u.) und dann bestimmt (s. u.).

Bei der Verwendung von Na H_2 $^{32}PO_4$ als Precursor wurde die Lezithinfraktion des Muskels von den übrigen Phospholipiden isoliert. Ein Aliquot der von den wasserlöslichen Verbindungen getrennten Lipidphase wurde entnommen und die Phospholipide nach den Angaben von Arvidson dünnschichtchromatografisch aufgetrennt (27).

8) Ionenpaarextraktion (28)

Zur zusätzlichen Reinigung des Cholins wurde nach der Chromatografie eine Ionenpaarextraktion vorgenommen. Hierzu wurden die eingetrockneten Proben in 1 ml Dipicrylaminlösung (0,01 M Dipikrylamin in 0,1 N NaOH) gelöst und mit 6 ml Dichlormethan geschüttelt.

Bei alkalischem pH liegt Dipicrylamin in undissoziierter Form vor und bildet mit Cholin ein Ionenpaar. Dieser Komplex ist lipophil und löst sich in Dichlormethan. Mit Hilfe eines Phasentrennfilters wurde dann das Dichlormethan von der wässrigen Phase getrennt und mit 2 ml 0,05 N HCl angesäuert: Durch die Ansäuerung wurde die Ionenpaarbindung gelöst und das Cholin in die wässrige Phase überführt. Hiervon wurde dann ein Aliquot zur Bestimmung entnommen.

9) Bestimmung der Cholinkonzentration (29)

0,2 bis 0,4 ml der in Wasser gelösten, zu bestimmenden Proben wurden mit 0,1 N NaOH auf 0,5 ml ergänzt und gegen 3 ml Dipicrylamin in Dichlormethan (1 mg Dipicrylamin in 100 ml Dichlormethanlösung) ausgeschüttelt. 2,5 ml der Dichlormethanphase wurden abgenommen, mit $Na_2 So_4$ entwässert und die Extinktion im Zeiß Photometer bei 420 nm in Mikrorohrküvetten gegen Dichlormethan bestimmt. An Hand einer Cholin-Eichreihe wurde die Konzentration berechnet.

10) Messung der Radioaktivität

0,2 bis 1 ml der in Wasser gelösten Proben wurden mit 10 ml einer Szintillatorlösung in Dioxan aufgenommen (100 g Naphthalin, 10 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO), 0,25 g 2,2'-p-Phenylen-bis (4-Methyl-5-Phenyloxazol) (Dimethyl-POPOP) pro 1 l Dioxan).

Die Impulse wurden in einem Flüssigkeitsszintillationszähler Packard Tricarb Modell 3314 gemessen.

Die Standardstreuung betrug höchstens 2,5 %.

11) Phenobarbital-Vorbehandlung

Die Tiere erhielten pro 100 g 0,2 ml einer 4 prozentigen Lösung von Phenobarbital-Na (Fa. Merck) in physiologischer Kochsalzlösung i. p. injiziert. Die Injektionen erfolgten am 1. Tag morgens und abends, an den folgenden 2 Tagen nur morgens. 24 Stunden nach der letzten Dosis wurden die Tiere getötet und die Organe zur Analyse entnommen.

Phenobarbital hatte keinen Einfluß auf das Körpergewicht. Das relative Lebergewicht nahm unter der Behandlung um ca. 24 % zu.

12) Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des t-Testes nach Student.

III. Ergebnisse

1) Die Konzentrationen im Blut und der Skelettmuskulatur sowie deren Beeinflussung durch Phenobarbital

a) Cholin im Blut (Tabelle Nr. 1)

Nach der Phenobarbitalbehandlung ist die Konzentration von Cholin im Blut erniedrigt. Der Normalwert beträgt 11,1 nMol Cholin/ml Blut. Dieser Wert stimmt mit den in der Literatur angegebenen Messungen überein (30, 31). Nach Phenobarbital kommt es zu einer signifikanten Abnahme um 25 % auf 8,4 nMol Cholin/ml.

b) Cholin, Phosphorylcholin, Lipidcholin und Glycerylphosphorylcholin in der Skelettmuskulatur (Tabelle Nr. 1)

Die Normalwerte der drei wasserlöslichen Verbindungen Cholin, Phosphorylcholin und Glycerylphosphorylcholin liegen in der gleichen Größenordnung. Sie betragen 50,- 63,- und 46 nMol/g Feuchtgewicht. Im Lipid liegt etwa 100 x mehr Cholin vor. Die Konzentration bei unbehandelten Tieren beträgt 6560 nMol/g Muskel.

Nach Phenobarbital sind die Konzentrationen von Cholin und Phosphorylcholin signifikant niedriger. Cholin nimmt um 53 % auf 23,1 nMol/g ab und Phosphorylcholin um 19 % auf 51,3 nMol/g.

Die Konzentrationen des Lipidcholins und des Glycerylphosphorylcholins bleiben unverändert.

2) Einbau von radioaktiv markiertem Cholin in die Bausteine des Lipidcholinstoffwechsels des Skelettmuskels (Zeichnung Nr. 5)

Nach Inkorporationszeiten von 20 Minuten, 1,3 und 6 Stunden wurde der Einbau von markiertem Cholin (^{14}C-Methyl) in das

Tabelle 1

Die Konzentrationen an freiem Cholin, Phosphorylcholin, Lipidcholin und Gylcerylphosphorylcholin im Skelettmuskel sowie an freiem Cholin im Gesamtblut

Kontrollen: an 3 Tagen 4 x 0.2 ml 0.9 % NaCl i.p., Phenobarbital: an 3 Tagen 4 x 80 mg/kg Phenobarbital i.p., 24 Std. nach der letzten Dosis getötet.

Mittelwerte und Standardabweichung

In Klammern: Anzahl der untersuchten Tiere

Verbindung	Konzentration*		Veränderung**	Signifikanz
	Kontrollen	Phenobarbital		
Cholin (Blut)	11.1 ± 1.8 (29)	8.4 ± 1.5 (32)	- 25 %	$p < 0{,}001$
Cholin (Muskel)	49.6 ± 11.6 (35)	23.1 ± 5.5 (35)	- 53 %	$p < 0.001$
Phosphorylcholin (Muskel)	63.5 ± 11.4 (16)	51.3 ± 10.9 (16)	- 19 %	$p < 0.005$
Lipidcholin (Muskel)	6560 ± 615 (58)	6460 ± 640 (64)	-	-
Glycerylphosphorylcholin (Muskel)	46.0 ± 10.4 (16)	42 ± 9 (16)	-	-

*nMol Cholin/g Feuchtgewicht

**in Prozent der Kontrollen

Cholin des Blutes, das Cholin des Muskels und in Phosphorylcholin, Lipidcholin und Glycerylphosphorylcholin des Skelettmuskels untersucht. Die Tiere erhielten pro 100 g 12/uCi Cholinchlorid (^{14}C-Methyl) gelöst in 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung in die Schwanzvene injiziert. Jeder Wert ist das Mittel der von vier Tieren genommenen Werte.

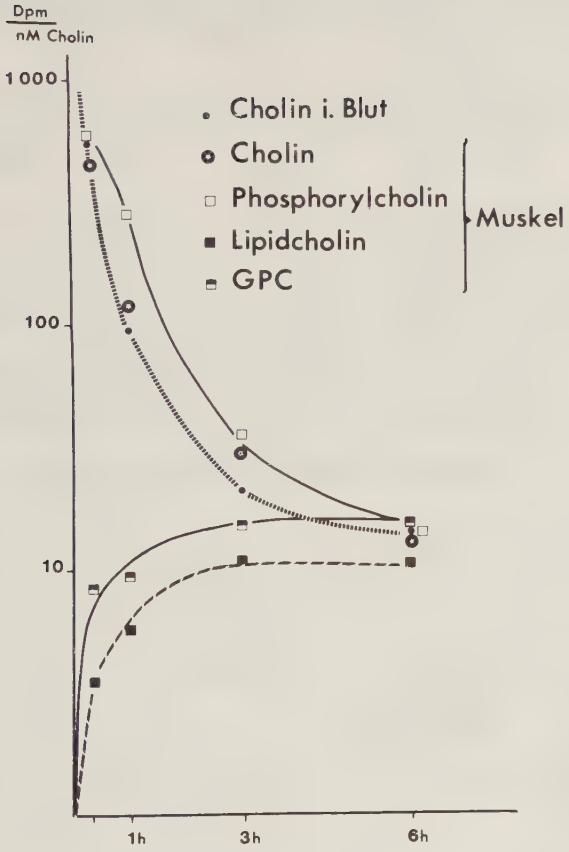
Im Cholin von Blut und Muskel sind die spezifischen Aktivitäten etwa gleich groß. Beide Kurven fallen steil ab und liegen deutlich über der Kurve des Lipidcholins.

Nach 20 Minuten Inkorporationszeit sind noch etwa 1 ‰ des injizierten Cholins im Blut zu finden. Zu diesem Zeitpunkt schneidet die Kurve der spezifischen Aktivität des Phosphorylcholins im Muskel die des Cholins und verläuft danach abfallend oberhalb der des Cholins. Im Glycerylphosphorylcholin, dem Abbauprodukt des Lizithin, wird bei allen Inkorporationszeiten eine deutlich höhere spezifische Aktivität als im Lipidcholin gemessen.

Der Einbau von Cholin in das Lipidcholin ist aus der Kurve der spezifischen Aktivitäten zu erkennen. Sie hat nach etwa 3 - 4 Stunden ihr Maximum erreicht und verläuft in den nächsten 3 Stunden annähernd horizontal.

3) Der Einfluß von Phenobarbital auf den Einbau von Cholin

Der im vorigen Abschnitt beschriebene Einbau von Cholin in die verschiedenen Verbindungen wird nun verglichen mit dem Einbau von Cholin bei Ratten, die mit Phenobarbital vorbehandelt wurden. Die Versuchsanordnung ist die gleiche. In Tabelle Nr. 2 und Zeichnung Nr. 6 ist die im Cholin des Blutes gemessene Radioaktivität pro ml Blut dargestellt.



Zeichnung 5

Der Einbau von Cholin in die Bausteine des Lipidcholinstoffwechsels des Skelettmuskels.

Halblogarithmische Darstellung der Mittelwerte der spezifischen Aktivitäten, n = 4

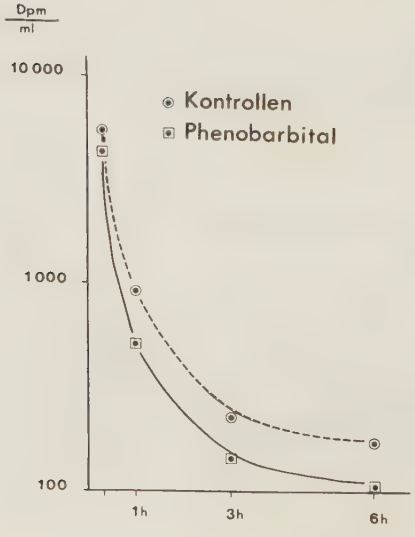
Tabelle 2

Radioaktivität im Cholin des Blutes nach i.v.-Injektion von 12 µCi/100 g Cholin (^{14}C-Methyl)

Kontrollen: an 3 Tagen 4 x 0.2 ml 0.9 % NaCl i.p.,
Phenobarbital: an 3 Tagen 4 x 80 mg/kg Phenobarbital i.p.,
24 Std. nach der letzten Dosis getötet;
Mittelwerte mit Standardabweichung, n = 4

Inkorporationszeit	Kontrollen	Phenobarbital	Veränderung*	Signifikanz
	Dpm/ml	Dpm/ml		
20 min	5491 ± 290	4340 ± 440	- 21 %	$p < 0.01$
1 h	913 ± 120	506 ± 50	- 45 %	$p < 0.001$
3 h	226 ± 48	142 ± 37	- 37 %	$p < 0.05$
6 h	172 ± 6	109 ± 20	- 37 %	$p < 0.001$

*Prozentuale Veränderung gegenüber den Kontrollwerten



Zeichnung 6

Radioaktivität im Cholin des Blutes

Halblogarithmische Darstellung der in Tab. 2 gezeigten Mittelwerte

Phenobarbitalbehandlung hat zur Folge, daß die Konzentration von markiertem Cholin im Blut signifikant geringer ist. Die Verminderung beträgt etwa 40 %, nur bei 20 Minuten wurden 21 % Verminderung gemessen.

In Tabelle Nr. 3 und Zeichnung Nr. 7 sind die spezifischen Aktivitäten, d. h. die Radioaktivität pro nMol Cholin eingetragen.

Da nach Phenobarbital eine um ca. 40 % geringere Konzentration an markiertem Cholin vorliegt und zugleich der Cholingehalt um ca. 25 % abgenommen hat, ist die Differenz in Tabelle Nr. 3 zwischen behandelten und Kontrollratten nicht mehr so ausgeprägt wie in Tabelle Nr. 2. Das im Blut vorhandene Cholin enthält bei den behandelten Ratten etwa 20 % weniger markierte Moleküle als bei den Kontrollen.

In Tabelle Nr. 4 und Zeichnung Nr. 8 sind die Mittelwerte der im freien Cholin des Skelettmuskels gemessenen spezifischen Aktivitäten gezeigt. Nach Inkorporationszeiten von einer-, drei- und sechs Stunden kommt es bei den behandelten Tieren zu einer signifikanten Abnahme der spezifischen Aktivitäten um etwa 45 %. Nach 20 Minuten Inkorporationszeit ist die Verminderung geringer und beträgt nur 11 %.

Der Cholineinbau in das Phosphorylcholin ist in Tabelle Nr. 5 und Zeichnung Nr. 9 dargestellt. Nach Phenobarbitalbehandlung ist die spezifische Aktivität zu jeder Inkorporationszeit signifikant geringer.

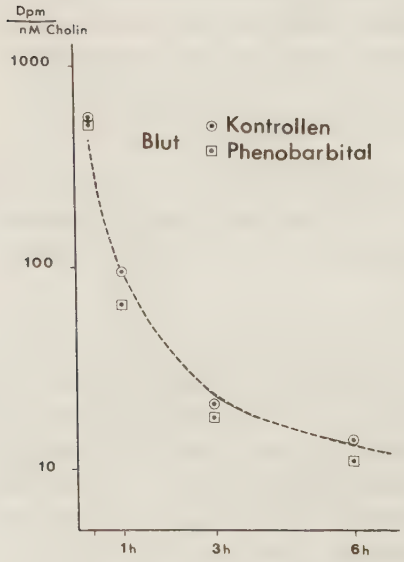
Ganz anders ist es im Lipidcholin, denn die Inkorporation ist nach Phenobarbital nicht vermindert, sondern erheblich verstärkt. Das geht aus Tabelle Nr. 6 und Zeichnung Nr. 10 hervor. Nach Phenobarbitalbehandlung wird mehr Radioaktivität eingebaut, die Kurve aus den spezifischen Aktivitäten steigt bei den behandelten Tieren erheblich steiler an und erreicht ihr Maximum bereits nach etwa 1 Stunde. In den weiteren 11 Stunden verläuft sie annähernd horizontal.

Tabelle 3

Spezifische Aktivität im Cholin des Blutes nach i.v.-Injektion von 12 µCi/100 g Cholin (^{14}C-Methyl)
Kontrollen: an 3 Tagen 4 x 0.2 ml 0.9 % NaCl i.p.,
Phenobarbital: an 3 Tagen 4 x 80 mg/kg Phenobarbital i.p.,
24 Std. nach der letzten Dosis getötet; Mittelwerte mit Standardabweichung, n = 4

Inkorporationszeit	Kontrollen Dpm/nMol Cholin	Phenobarbital Dpm/nMol Cholin	Veränderung*	Signifikanz
20 min	552 ± 223	515 ± 103	- 7 %	-
1 h	95 ± 8.8	66.5 ± 7.1	- 30 %	$p < 0.005$
3 h	20.7 ± 3.8	17.8 ± 3.3	- 14 %	$p < 0.3$
6 h	14 ± 1	11.2 ± 1	- 20 %	$p < 0.005$

*in Prozent der Kontrollen



Zeichnung 7

Spezifische Aktivität im Cholin des Blutes

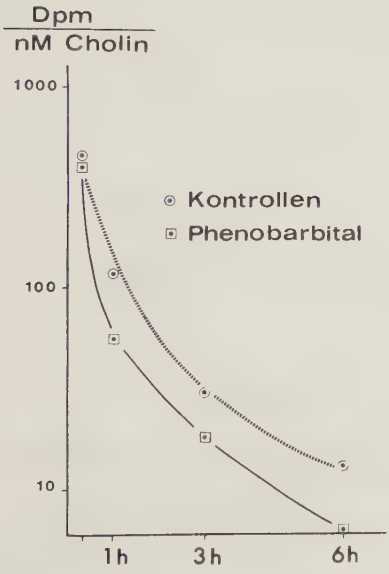
Halblogarithmische Darstellung der in Tab. 3 gezeigten Mittelwerte

Tabelle 4

Spezifische Aktivität im freien Cholin des Skelettmuskels nach i.v.-Injektion von 12 µCi/100 g Cholin (14-C-Methyl) Kontrollen: an 3 Tagen 4 x 0.2 ml 0.9 % NaCl i.p., Phenobarbital: an 3 Tagen 4 x 80 mg/kg Phenobarbital i.p. 24 Std. nach der letzten Dosis getötet, Mittelwerte mit Standardabweichung, n = 4

Inkorporationszeit	Kontrollen	Phenobarbital	Veränderung*	Signifikanz
	Dpm/nMol	Dpm/nMol		
20 min	453 ± 56	403 ± 62	- 11 %	$p < 0.3$
1 h	117 ± 22	55 ± 12.5	- 52 %	$p < 0.005$
3 h	30.4 ± 8.1	18.2 ± 4.2	- 40 %	$p < 0.05$
6 h	12.7 ± 1.5	6.3 ± 0.8	- 50 %	$p < 0.001$

*in Prozent der Kontrollen



Zeichnung 8

Spezifische Aktivität im freien Cholin des Skelettmuskels.

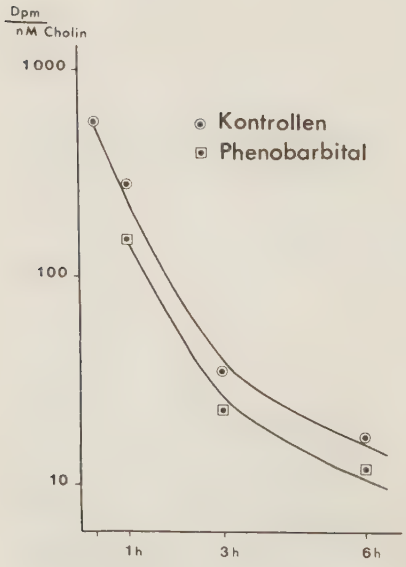
Halblogarithmische Darstellung der in Tab. 4 gezeigten Mittelwerte

Tabelle 5

Spezifische Aktivität im Phosphorylcholin des Skelettmuskels nach i.v.-Injektion von 12 µCi/100 g Cholin (^{14}-C-Methyl)
Kontrollen: an 3 Tagen 4 x 0.2 ml 0.9 % NaCl, Phenobarbital: an 3 Tagen 4 x 80 mg/kg Phenobarbital i.p., 24 Std. nach der letzten Dosis getötet, Mittelwerte mit Standardabweichung, n = 4

Inkorporationszeit	Kontrollen	Phenobarbital	Veränderung*	Signifikanz
	Dpm/nMol Cholin	Dpm/nMol Cholin		
20 min	561 ± 70	-	-	-
1 h	280 ± 48	153 ± 3	- 45 %	$p < 0.005$
3 h	34.8 ± 8.4	23.4 ± 1.9	- 33 %	$p < 0.05$
6 h	16.8 ± 2.1	12.2 ± 0.8	- 27 %	$p < 0.01$

*in Prozent der Kontrollen



Zeichnung 9

Spezifische Aktivität im Phosphorylcholin

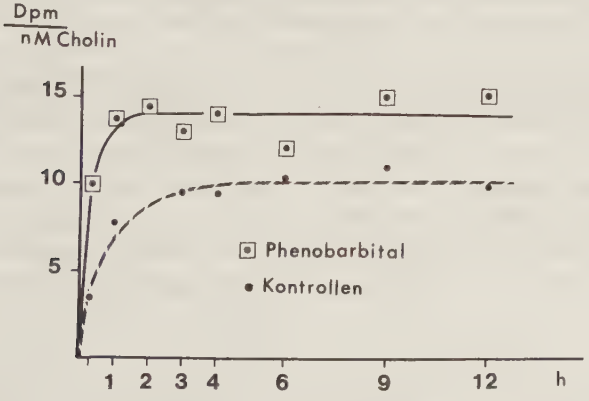
Halblogarithmische Darstellung der in Tab. 5 gezeigten Mittelwerte

Tabelle 6

Der Einfluß von Phenobarbital auf den Einbau von i.v.-injiziertem Cholin (^{14}-C-Methyl) in das Lipidcholin des Skelettmuskels. Kontrollen: an 3 Tagen 4 x 0.2 ml 0.9 % NaCl i.p., Phenobarbital: an 3 Tagen 4 x 80 mg/kg Phenobarbital i.p., 24 Std. nach der letzten Dosis getötet. Mittelwerte mit Standardabweichung. In Klammern Anzahl der untersuchten Tiere.

Inkorporationszeit	Kontrollen Dpm/nMol Cholin	Phenobarbital Dpm/nMol Cholin	Veränderung*	Signifikanz
20 min	3.45 ± 0.83 (4)	10.0 ± 1.2 (4)	+ 190 %	$p < 0.001$
1 h	7.8 ± 2.0 (11)	13.7 ± 1.6 (11)	+ 76 %	$p < 0.001$
2 h	-	14.4 ± 1.3 (8)	-	-
3 h	9.5 ± 2.3 (11)	13.0 ± 1.7 (11)	+ 37 %	$p < 0.001$
4 h	9.4 ± 3.4 (8)	14.1 ± 2.4 (5)	+ 50 %	$p < 0.02$
6 h	10.3 ± 1.2 (12)	12.0 ± 2.1 (12)	+ 16 %	$p < 0.05$
9 h	11.0 ± 1.2 (4)	15.3 ± 3.3 (4)	+ 39 %	$p < 0.1$
12 h	9.8 ± 2.3 (4)	15.1 ± 3.8 (4)	+ 54 %	$p < 0.1$

*in Prozent der Kontrollen



Zeichnung Nr. 10

Der Einfluß von Phenobarbital auf den Einbau von i.v.-injiziertem Cholin (^{14}-C-Methyl) in das Lipidcholin des Skelettmuskels.
Darstellung der in Tabelle Nr. 6 gezeigten Mittelwerte

Bei den Kontrolltieren hat der Einbau von Cholin ins Lipid erst nach 3 - 4 Stunden sein Maximum erreicht und ist erheblich geringer. Danach verläuft die Kurve ebenfalls horizontal.

Aus dem horizontalen Kurvenabschnitt geht hervor, daß das Lipidcholin der behandelten Tiere etwa 40 % mehr Radioaktivität enthält als das der unbehandelten Ratten.

4) Einbau von Radioaktivität aus Cholin, das in der Kette markiert ist

An Stelle des bisher verwendeten Cholins, das an der Methylgruppe radioaktiv markiert war, wurde Cholin verwendet, das in der Kohlenstoffkette markiert war. Nach 1 Stunde Inkorporationszeit wurde bei jeweils 4 behandelten und 4 Kontrollratten die spezifische Aktivität im Cholin und im Lipidcholin bestimmt. Damit sollte geklärt werden, ob die Veränderungen unter Phenobarbital durch eine Beeinflussung des Stoffwechsels der im Cholin enthaltenen Methylgruppen oder des gesamten Cholinmoleküls bedingt sind.

Die Ergebnisse sind in Tabelle Nr. 7 und Nr. 8 dargestellt. Es ist zu sehen, daß sich das in der Kohlenstoffkette markierte Cholin unter Phenobarbital ebenso verhält wie das in der Methylgruppe markierte. Das freie Cholin nimmt sowohl in der Konzentration als auch in der spezifischen Aktivität erheblich ab und im Lipidcholin wird bei gleichbleibender Konzentration wesentlich mehr Radioaktivität gemessen.

5) Der Einbau von Methionin (^{3}H-Methyl) in die Bausteine des Lipidcholinstoffwechsels von Leber und Muskel (Tabelle Nr. 9)

In diesem Versuch wurde radioaktives Methionin injiziert und der zeitliche Verlauf des Einbaus von Methylgruppen

Tabelle 7

Der Einfluß von Phenobarbital auf die Konzentration an Cholin in der Skelettmuskulatur sowie auf den Einbau von i.v. injiziertem Cholin-1,2-^{14}C-Chlorid.

Inkorporationszeit: 1 Std., Kontrollen: an 3 Tagen 4 x 0.2 ml 0.9 % NaCl, Phenobarbital: an 3 Tagen 4 x 80 mg/kg Phenobarbital i.p., 24 Std. nach der letzten Dosis getötet, Mittwelwerte mit Standardabweichung, n = 4

		Kontrollen	Phenobarbital	Veränderung*	Signifikanz
Freies Cholin	nMol Cholin/g	42.4 ± 4.9	24.5 ± 6	- 42 %	$p < 0.005$
	Dpm/nMol Cholin	72.8 ± 11.4	32.7 ± 7	- 55 %	$p < 0.001$

*In Prozent der Kontrollen

Tabelle 8

Der Einfluß von Phenobarbital auf die Konzentration an Lipidcholin in der Skelettmuskulatur sowie auf den Einbau von i.v. injiziertem Cholin-1,2-^{14}C-Chlorid.

Inkorporationszeit: 1 Std., Kontrollen: an 3 Tagen 4 x 0.2 ml 0.9 % NaCl, Phenobarbital: an 3 Tagen 4 x 80 mg/kg Phenobarbital i.p., 24 Std. nach der letzten Dosis getötet, Mittelwerte mit Standardabweichung, n = 4

		Kontrollen	Phenobarbital	Veränderung*	Signifikanz
Lipidcholin	nMol Cholin/g	6270 ± 428	5840 ± 200		
	Dpm/nMol Cholin	2.97 ± 0.31	5.01 ± 0.72	+ 69 %	$p < 0.001$

*in Prozent der Kontrollen

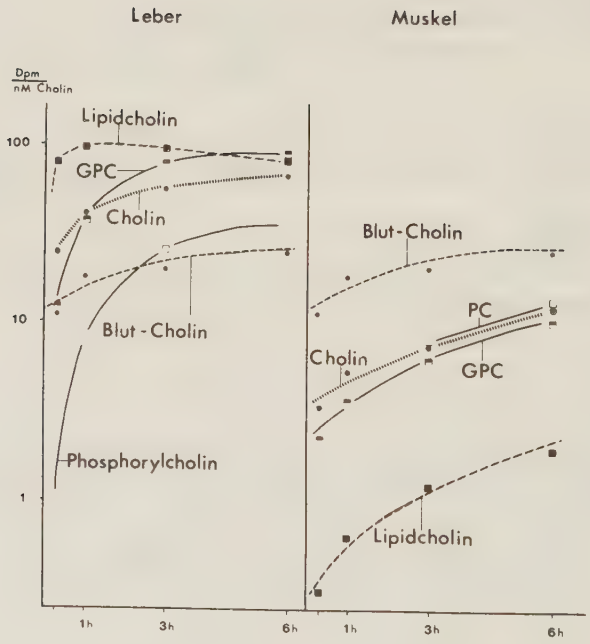


Abb. Nr. 11a + b

Der Einbau von Methionin (^{3}H-Methyl) in die Bausteine des Lipidcholinstoffwechsels von Leber und Muskel
Halblogarithmische Darstellung der in Tabelle Nr. 9 gezeigten Werte

in die Bausteine des Lipidcholinstoffwechsels von Leber und Muskel von unbehandelten Ratten untersucht. Es sollen hiermit Erkenntnisse über die Methylierung gewonnen werden.

Zeichnung Nr. 11a zeigt die Kurven der spezifischen Aktivitäten in der Leber. Die Methylgruppen des Methionin erscheinen zuerst im Lezithin. Das Maximum der spezifischen Aktivität ist nach etwa 1 Stunde erreicht, danach fällt die Kurve leicht ab. Dieser Befund stimmt mit früheren Ergebnissen überein (9).

Im Glycerylphosphorylcholin liegt die spezifische Aktivität bis zu 3 Stunden deutlich unter der des Lezithin. Danach weisen beide Verbindungen keinen Unterschied in der spezifischen Markierung mehr auf.

Die Kurven im Cholin und im Phosphorylcholin zeigen einen ansteigenden Verlauf. Im Cholin ist die spezifische Aktivität stets niedriger als im Lipidcholin und im Phosphorylcholin wird ständig weniger Radioaktivität gemessen als im Cholin.

Im Cholin des Blutes wird deutlich weniger Radioaktivität als im Cholin der Leber gemessen. Auch hier verläuft die Kurve ansteigend. Zeichnung Nr. 11b zeigt die spezifischen Aktivitäten in der Muskulatur und die schon bekannte Kurve des Blutes.

In den Verbindungen des Muskels wird stets weniger Radioaktivität gemessen als im Cholin des Blutes. Alle Kurven haben eine etwa gleiche Steigung.

Der Einbau von Methylgruppen in das Lezithin des Muskels unterscheidet sich in zwei Punkten von den Ergebnissen in der Leber. Erstens wird erheblich weniger Radioaktivität in den Muskel eingebaut und zweitens steigt die Kurve der spezifischen Aktivitäten im Lezithin des Muskels ständig an, während in der Leber das Maximum nach 1 Stunde Inkorporationszeit erreicht ist.

Tabelle 9

Der Einbau von Methionin (^{3}H-Methyl) in die Bausteine des Lipidcholinstoffwechsels von Leber und Muskel
Mittelwerte mit Standardabweichung, n = 4

Inkorporationszeit	20 min	1 h	3 h	6 h
	Dpm/nMol Cholin	Dpm/nMol Cholin	Dpm/nMol Cholin	Dpm/nMol Cholin
Leber				
Lipidcholin	79 ± 6.8	95.9 ± 5.9	94.2 ± 3.9	81.3 ± 7.1
GPC	12.3 ± 0.7	37 ± 6.1	76 ± 5.6	85.4 ± 10.4
Cholin	24.3 ± 4.6	42.1 ± 6.4	56 ± 3.6	66.2 ± 6.7
Phosphorylcholin	1.03 ± 0.47*	8.17 ± 1.55	25.6 ± 2.5	34.8 ± 2.4
Blut				
Cholin	11.0 ± 0.42*	18.0 ± 1.2	20.4 ± 1.9	24.5 ± 2.3
Muskel				
Lipidcholin	0.308 ± 0.05*	0.624 ± 0.15	1.21 ± 0.19	1.94 ± 0.25
GPC	2.2 ± 0.5*	3.6 ± 1.22	6.13 ± 0.14	9.9 ± 1.5
Cholin	3.28 ± 0.94*	5.3 ± 0.9	7.24 ± 1.5	12 ± 1.4
Phosphorylcholin	-	-	7.6 ± 0.65	12.8 ± 4.5

*n = 3

Die spezifischen Aktivitäten im Cholin und im Phosphorylcholin liegen im Muskel um ein Vielfaches über der des Lipidcholins, wobei die Werte von Phosphorylcholin und Cholin identisch sind. Beide Kurven liegen deutlich unter der des Cholins im Blut.

Im Glycerylphosphorylcholin sind die spezifischen Aktivitäten wieder deutlich höher als im Lezithin. Diese Differenz ist größer als bei der Anwendung von Cholin als Vorstufe.

6) Der Einfluß von Phenobarbital auf den Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat in das Phosphorylcholin, die Gesamtphospholipide und das Lezithin des Skelettmuskels

In dem nun folgenden Experiment wurde den Tieren radioaktiv markiertes Cholin (^{3}H-Methyl) und markiertes Phosphat simultan injiziert. Die gleichzeitige Injektion von Cholin diente der Überprüfung ob der Cholinstoffwechsel in der Skelettmuskulatur bei den behandelten Tieren wieder in der schon bekannten Weise verändert war. Da sich diese Befunde reproduzieren ließen, wird auf deren erneute Beschreibung verzichtet.

Der Einbau von Phosphat in das Phosphorylcholin ist in der Tabelle Nr. 10 gezeigt. Zu allen Inkorporationszeiten wird bei den behandelten Tieren eine niedrigere spezifische Aktivität gemessen. Wie der Anstieg der Werte zeigt, hat der Einbau nach 6 Stunden sein Maximum noch nicht überschritten.

Tabelle Nr. 11 und Zeichnung Nr. 12 zeigen den Einbau in die Gesamtphospholipide. Es wird deutlich, daß unter Phenobarbitalbehandlung die Kinetik des Einbaus von markiertem Phosphat nicht verändert ist. Das Maximum ist nach 6 Stunden Inkorporationszeit noch nicht überschritten.

Tabelle 10

Der Einfluß von Phenobarbital auf den Einbau von $^{32}PO_4^{---}$ in das Phosphorylcholin des Skelettmuskels der Ratte. Kontrollen: an 3 Tagen 4 x 0.2 ml 0.9 % NaCl i.p., Phenobarbital: an 3 Tagen 4 x 80 mg/kg Phenobarbital i.p., 24 Std. nach der letzten Dosis getötet; Mittelwerte mit Standardabweichung, n = 4

Inkorporationszeit	Kontrollen Dpm/nM Cholin	Phenobarbital Dpm/nM Cholin	Veränderung*	Signifikanz
20 min	16 ± 5	9 ± 1	- 44 %	$p < 0.3$
1 h	30 ± 7	21 ± 9	- 30 %	$p < 0.05$
3 h	25 ± 25	18 ± 4	- 28 %	$p < 0.1$
6 h	60 ± 8	32 ± 7	- 47 %	$p < 0.1$

*Prozentuale Veränderung gegenüber den Kontrollwerten

Tabelle 11

Der Einfluß von Phenobarbital auf den Einbau von $^{32}PO_4^{---}$ in die Phospholipide des Skelettmuskels der Ratte. Kontrollen: an 3 Tagen 4 x 0.2 ml 0.9 % NaCl i.p., Phenobarbital: an 3 Tagen 4 x 80 mg/kg Phenobarbital i.p., 24 Std. nach der letzten Dosis getötet; Mittelwerte mit Standardabweichung, n = 4

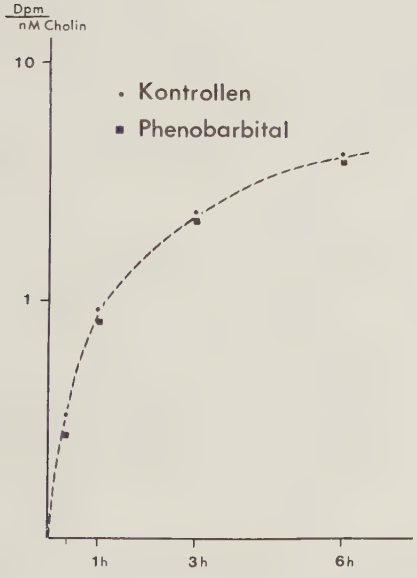
Inkorporationszeit	Kontrollen Dpm/nM Cholin	Phenobarbital Dpm/nM Cholin	Veränderung*
20 min	0.33 ± 0.03	0.27 ± 0.04	- 18 %
1 h	0.91 ± 0.07	0.81 ± 0.08	- 11 %
3 h	2.31 ± 0.2	2.14 ± 0.18	- 7 %
6 h	4.05 ± 0.61	3.86 ± 0.69	- 5 %

*Prozentuale Veränderung gegenüber den Kontrollwerten

Tabelle 12

Der Einfluß von Phenobarbital auf den Einbau von i.v.-injiziertem $^{32}PO_4^{---}$ in das Lezithin des Skelettmuskels der Ratte. Kontrollen: an 3 Tagen 4 x 0.2 ml 0.9 % NaCl, Phenobarbital: an 3 Tagen 4 x 80 mg/kg Phenobarbital i.p., 24 Std. nach der letzten Dosis getötet; Mittelwerte mit Standardabweichung, n = 4

Inkorporationszeit	Kontrollen Dpm/g	Phenobarbital Dpm/g
20 min	405 ± 62	449 ± 89
1 h	2190 ± 420	2150 ± 450
3 h	6300 ± 2540	6400 ± 1300
6 h	15600 ± 1160	13200 ± 200



Zeichnung 12

Der Einfluß von Phenobarbital auf den Einbau von $^{32}PO_4^{---}$ in die Phospholipide des Skelettmuskels der Ratte. Halblogarithmische Darstellung der in Tab. 11 gezeigten Mittelwerte

Die im Phosphorylcholin der behandelten Tiere gemessene Abnahme in der spezifischen Aktivität spiegelt sich, allerdings in deutlich geringerem Ausmaß, in den Gesamtphospholipiden wider.

Der Einbau von Phosphat in das Lezithin des Skelettmuskels ist in Tabelle Nr. 12 dargestellt.

Wie aus den Befunden der Gesamtphospholipide zu erwarten war, ist auch hier kein Unterschied in der Kinetik des Einbaus festzustellen. Die vorher gemessene geringfügige Abnahme des markierten Phosphat trat hier nicht in Erscheinung.

IV. Diskussion

Die Konzentrationen der untersuchten cholinhaltigen Verbindungen in der Skelettmuskulatur der Ratte sowie in vivo Untersuchungen des Einbaus radioaktiver Isotope in diese Substanzen waren bisher nicht bekannt.

Das Cholin des Blutes muß einen sehr hohen Umsatz haben, denn schon 20 Minuten nach Injektion von Cholin (^{14}C-Methyl) werden nur noch ca. 1 ‰ der injizierten Radioaktivität im Blut gemessen, was einer Halbwertszeit von etwa 2 Minuten entspricht. Die Werte der spezifischen Aktivitäten im Cholin des Blutes und im Cholin der Skelettmuskulatur sind zu den hier untersuchten Inkorporationszeiten etwa gleich. Hieraus ist zu schließen, daß zwischen diesen beiden Kompartimenten ein rascher Cholinaustausch besteht.

Die weitere Untersuchung des Einbaus von Radioaktivität in das Phosphorylcholin (PC) könnte die Frage klären, ob das PC seinen Cholinanteil ausschließlich aus dem freien Cholinpool erhält. In diesem Fall müßten die Kurven der spezifischen Aktivitäten eine direkte Precursor-Successor-Beziehung erkennen lassen. Da der Schnittpunkt beider Kurven mit der frühesten Inkorporationszeit von 20 Minuten zusammenfällt und danach die spezifische Aktivität im PC höher ist als im Cholin, ist anzunehmen, daß Cholin die direkte und alleinige Vorstufe für den Einbau ins PC darstellt. Die Annahme entspricht auch den Befunden von R. Mück (32), der mit der gleichen Anordnung zu noch früheren Inkorporationszeiten das Erscheinen von Radioaktivität im Cholin und PC nach Gabe von markiertem Cholin untersuchte und eine Precursor-Successor-Beziehung mit einem Schnittpunkt der beiden Kurven bei 20 Minuten nachwies.

Die spezifische Aktivität des Lipidcholins war zu allen Zeiten deutlich niedriger als die spezifischen Aktivitäten von Cholin und von PC. Das Maximum lag bei etwa 3 Stunden.

Bestünde eine direkte Precursor-Successor-Beziehung zwischen Cholin, PC, CDP-Cholin und Lezithin, dann hätten sich die Kurven nacheinander in der Reihenfolge schneiden müssen. Das war nicht der Fall, so daß zu schließen ist, daß der von Kennedy und Weiss in der Leber entdeckte und 1969 auch im Skelettmuskel in vitro nachgewiesene Syntheseweg (33) nicht die einzige Möglichkeit der Lezithinsynthese in diesem Organ ist. Eine andere Erklärung wäre das Vorhandensein von Lezithinfraktionen mit unterschiedlichem Umsatz. Dabei würde eine Lezithinfraktion mit einem raschen Umsatz nach kurzer Zeit ihr Maximum der spezifischen Aktivität haben. Wenn diese mit einer Fraktion gemischt vorliegt, die einen trägen Umsatz hat, würde anfangs eine geringere spezifische Aktivität gemessen werden.

Auch die Befunde der spezifischen Aktivitäten des GPC sprechen für das Vorhandensein von Lezithinfraktionen mit unterschiedlichem Umsatz. Denn zu allen untersuchten Inkorporationszeiten ist das GPC höher markiert als das Lezithin, woraus man wiederum schließen muß, daß es aus einer höher markierten Lezithinfraktion stammt. Auch im Rattenhirn konnte von uns eine deutlich höhere spezifische Aktivität im GPC als im Lezithin nachgewiesen werden (34).

Die in dieser Arbeit gezeigten, durch Phenobarbital hervorgerufenen Veränderungen im Cholinstoffwechsel waren bisher nicht bekannt.

Ausgangspunkt der Untersuchungen bildeten die zunächst schwer zu interpretierenden Veränderungen der Konzentration des Cholins im Blut. Nach Gabe von ^{14}C-Methyl-Cholin hätte man bei den behandelten Tieren eine höhere spezifische Aktivität erwarten können, denn die Konzentration von Cholin ist nach Phenobarbitalbehandlung vermindert. Gemessen wurde jedoch auch eine Verminderung der spezifischen Radioaktivität des Cholins im Blut.

Das bedeutet, daß der Umsatz des Blutcholins nach Vorbehandlung mit Phenobarbital beschleunigt ist. Unmittelbar

nach der Injektion des radiomarkierten Cholins muß bei verminderter Konzentration die spezifische Aktivität des Cholins im Blut der behandelten Tiere höher sein. Der beschleunigte Abstrom von markierten und Zustrom von unmarkierten Cholinmolekülen führt dann dazu, daß die abfallenden Kurven der spezifischen Aktivitäten sich schneiden und schließlich die Kurve der behandelten Tiere unter der der Kontrolltiere liegt. Als Ursache für den beschleunigten Abstrom von Cholinmolekülen aus dem Blut ist ein beträchtlich und deutlich vermehrter Einbau von Cholin in das Lezithin der Skelettmuskulatur anzusehen.

Der vermehrte Einbau von Cholin in das Lezithin ist nicht mit einer Zunahme von Lezithin verbunden. Sowohl die Lipidcholinkonzentration als auch die Kinetik des Einbaus von $^{32}PO_4^{---}$ in das Lezithin sind unverändert. Letztere hätte sich, einen gesteigerten Kennedy-Weiss-Weg vorausgesetzt, deutlich von den Kontrolltieren unterscheiden müssen, da in diesem Fall auch vermehrt ATP zur Bildung von PC verbraucht worden wäre.

Auch eine verstärkte Umwandlung von Lysolezithin zu Lezithin hätte die Kinetik des inkorporierten $^{32}PO_4^{---}$ verändern müssen und kommt daher als Ursache der beobachteten Veränderungen nicht in Betracht.

Mit Hilfe eines Versuchs, in dem an Stelle des in der Methylgruppe markierten Cholins in der Kohlenstoffkette markiertes Cholin verwendet wurde, konnte die Möglichkeit ausgeschlossen werden, daß die Veränderungen im Lezithin lediglich durch einen verstärkten Einbau von Methylgruppen hervorgerufen wurden.

Nur ein gesteigerter Basenaustausch kann die Befunde im Lipidcholin und im Cholin des Skelettmuskels erklären:

1. Durch den vermehrten Basenaustausch wird das Lipidcholin schneller und höher markiert.

2. Durch denselben Effekt verliert das Cholin schneller seine Aktivität.

Würde der Basenaustausch nun allein mit Phosphatidylcholin erfolgen, so wären dies beides die einzigen zu erwartenden Befunde. Eine Erklärung für die Verringerung der Menge des Cholins in Muskel und Blut wäre dadurch nicht gegeben, denn es würde lediglich markiertes gegen unmarkiertes Cholin ausgetauscht werden. Wenn aber auch Cholin gegen Äthanolamin oder Serin der Kephaline ausgetauscht werden würde, müßte die Gesamtmenge des Cholins abnehmen, was tatsächlich beobachtet wurde.

Es müßte allerdings auch eine Nettosynthese von Phosphatidylcholin erfolgen, die nicht festgestellt werden konnte.

Möglicherweise ist sie vorhanden, macht sich jedoch im Verhältnis zu dem großen Phosphatidylcholinpool nicht bemerkbar, sondern fällt nur bei dem kleinen Pool des freien Cholins ins Gewicht.

Die Untersuchung der spezifischen Aktivitäten verschiedener Inkorporationszeiten im freien Cholin, PC, Lezithin und GPC der Leber nach Injektion von Methionin läßt eine Aussage darüber machen, auf welcher Stufe die Methylgruppen eingebaut werden. Das heißt, es ist erkennbar, ob in der Leber Cholin, PC, Lezithin oder GPC durch Methylierung von Äthanolamin, Phosphoryläthanolamin, Phosphatidyläthanolamin oder Glycerylphosphoryläthanolamin entsteht, oder ob nur eine der Substanzen durch Methylierung entsteht und die Radioaktivität sekundär auch in den Folgeprodukten erscheint.

Der schnellste Einbau von Methylgruppen erfolgt in das Phosphatidyläthanolamin, denn im Lezithin wird die höchste spezifische Aktivität gemessen. Danach folgen jeweils mit deutlichem Abstand GPC, Cholin und PC. Hiermit werden frühere in vitro Untersuchungen bestätigt, die zeigten, daß das überwiegende Substrat der Methylierung in der Leber Phosphatidyläthanolamin ist und nicht etwa Äthanolamin oder Phosphoryläthanolamin (14, 16).

Die weitere Reihenfolge beim Einbau von Radioaktivität in das GPC, das Cholin und das PC macht es sehr wahrscheinlich, daß die Methylgruppen durch den Abbau von Lezithin ins GPC und weiter ins Cholin und PC gelangen.

Bei der Betrachtung der Kurven des GPC und des Cholins fällt auf, daß zu den ersten beiden Inkorporationszeiten das Cholin höher markiert ist. Dieser Befund widerspricht zunächst der obigen Behauptung über den Einbau von Methylgruppen, wonach die spezifische Aktivität im GPC höher als im freien Cholin sein sollte.

Ein in der Leber vorhandener Basenaustausch, wie er nach in vivo Untersuchungen vermutet wird (35), kann jedoch die anfangs höhere Markierung im freien Cholin erklären.

Der weitere Einbau von radioaktiven Methylgruppen in die entsprechenden Verbindungen des Muskels zeigt ein völlig anderes Bild.

Verglichen mit der Leber wird in das Lezithin erheblich weniger Radioaktivität eingebaut. Das Maximum des Einbaus ist nach 6 Stunden noch nicht überschritten, in der Leber hingegen liegt es bei etwa 2 Stunden. In diesen beiden Punkten, der Differenz des Einbaus von Radioaktivität und dem unterschiedlichen Kurvenverlauf, entspricht der Muskel den Organen Lunge, Niere, Dünndarm und Herz (9). Es inter-

essiert nun die Frage, wie die im Lezithin der Muskulatur gemessenen radioaktiven Methylgruppen dorthin gelangen. Verschiedene Möglichkeiten sind denkbar:

1. Wie in der Leber wird in der Muskulatur überwiegend Phosphatidyläthanolamin zu Lezithin methyliert.

2. In der Leber durch Methylierung entstandenes Phosphatidylcholin wird über das Blut in die Muskulatur transportiert und dort in das Lezithin eingebaut.

3. Cholin der Leber, entstanden durch den Abbau von Lezithin, welches durch die Methylierung von Phosphatidyläthanolamin synthetisiert wurde, tritt als Cholin ins Blut und von dort in die Muskulatur über und wird dann über den Kennedy-Weiss-Weg in das Lezithin eingebaut.

Die Reihenfolge des Einbaus von Radioaktivität in die Verbindungen der Leber, das Cholin des Blutes und schließlich in das Cholin und Lezithin der Muskulatur läßt die 3. Möglichkeit sehr wahrscheinlich werden. Wenn somit auch nicht die unter 1. und 2. angeführten Stoffwechselschritte ausgeschlossen sind, so treten sie quantitativ gegenüber dem direkten Cholineinbau zurück. Mit Sicherheit könnte dies jedoch nur behauptet werden, wenn die spezifische Aktivität in der Vorstufe, dem Methionin, gemessen worden wäre.

Im GPC ist wiederum die spezifische Aktivität höher als im Lezithin, was darauf hinweist, daß es Lezithinfraktionen mit unterschiedlichem Umsatz in der Muskulatur geben muß.

V. Zusammenfassung

Bei der Ratte wurden die Konzentrationen an Cholin, Phosphorylcholin, Lipidcholin und Glycerylphosphorylcholin in der Skelettmuskulatur sowie von Cholin im Blut bestimmt. Der Einbau von in der Methylgruppe und in der Kette radiomarkiertem Cholin, an der Methylgruppe markiertem Methionin und mit ^{32}P markiertem Phosphat in diese Verbindungen wurde nach Inkorporationszeiten von 20 Min. bis 6 Std. untersucht. Hierbei wurden folgende Befunde erhoben:

1. Das freie Cholin des Blutes hat eine Halbwertszeit von etwa 2 Minuten.

2. Zwischen dem Cholin des Blutes und dem der Skelettmuskulatur besteht ein rascher Austausch, denn zu allen Inkorporationszeiten haben beide gleich hohe spezifische Aktivitäten.

3. Der Verlauf der spezifischen Aktivitäten im Cholin und im Phosphorylcholin des Muskels bekräftigt frühere Befunde (32), die eine direkte Precursor-Successor-Beziehung zwischen diesen beiden Verbindungen nachwiesen.

4. Der Einbau von Cholin in das Lipidcholin hat nach 3 - 4 Stunden sein Maximum erreicht. Danach verläuft die Kurve der spezifischen Aktivität, bis 12 Stunden verfolgt, horizontal.

5. Die spezifischen Aktivitäten der Lezithinvorstufen Cholin und Phosphorylcholin sind stets höher als die des Lipidcholins; ebenso liegt die spezifische Aktivität des Lezithinabbauproduktes Glycerylphosphorylcholin zu allen Zeiten höher als die des Lipidcholins.

Aus diesen beiden Befunden ist zu folgern, daß es in der Skelettmuskulatur Lezithinfraktionen mit verschieden raschem Umsatz gibt.

24 Stunden nach viermaliger Vorbehandlung mit je 80 mg/kg Phenobarbital liegen im Phosphatidylcholinstoffwechsel folgende Veränderungen vor:

1. Die Konzentrationen des Cholins im Blut, im Skelettmuskel sowie des Phosphorylcholins im Skelettmuskel sind um 25 %, 53 % sowie 19 % deutlich verringert.

2. Nach Applikation von markiertem Cholin fällt die spezifische Aktivität von Cholin im Blut schneller ab und dadurch ist auch die spezifische Aktivität von Cholin und Phosphorylcholin in der Skelettmuskulatur geringer. Der Einbau von Radioaktivität in das Lipidcholin des Skelettmuskels ist dagegen erheblich beschleunigt und vermehrt.

3. Die Veränderungen des Einbaus von Cholin in das Lezithin sind bei der Anwendung von Cholin, das in der Methylgruppe markiert ist, genauso wie bei der Anwendung von Cholin, das in der Kohlenstoffkette markiert ist. Die erhöhte spezifische Aktivität im Lipidcholin nach Phenobarbitalbehandlung kann infolgedessen nicht durch einen gesteigerten Einbau von Methylgruppen, sondern muß durch einen gesteigerten Einbau des gesamten Cholinmoleküls bedingt sein.

4. Die Kinetik des Einbaus von radiomarkiertem Phosphat in das Phosphorylcholin, das Lezithin und die Gesamtphospholipide der Skelettmuskulatur ist unter Phenobarbital nicht verändert. Durch diesen Befund ist eine Steigerung der Synthese über den Kennedy-Weiss-Weg ausgeschlossen. Ebenso müßte sich bei einer verstärkten Umwandlung von Lysolezithin zu Lezithin die Phosphatkinetik ähnlich wie die Cholinkinetik verhalten, so daß auch diese Möglichkeit nicht als Erklärung in Frage kommt.

5. Ein durch Phenobarbital gesteigerter oder vielleicht auch erst hervorgerufener Basenaustausch kann die Befunde erklären:
Der Austausch von freiem gegen lipidgebundenes Cholin muß anfangs, solange die spezifische Aktivität des Cholins höher

ist als die des Phosphatidylcholins zu einer Verringerung der spezifischen Aktivität im Cholin und zu einer Erhöhung im Lipidcholin führen. Die Abnahme der Konzentration des Cholins wird durch einen ebenfalls vorhandenen Austausch gegen lipidgebundenes Äthanolamin oder Serin hervorgerufen; die zu erwartende Nettozunahme von Lipidcholin wurde nicht erfaßt, weil in Anbetracht des verhältnismäßig großen Lipidcholinpools von mehr als 6000 nM/g eine Zunahme von weniger als 5 % nicht feststellbar ist. Dagegen werden schon geringfügige Veränderungen des viel kleineren Cholinpools (50 nMol/g) ohne weiteres sichtbar.

Der Einbau von radiomarkierten Methylgruppen aus Methionin in das Cholin erfolgt in der Leber anders als in der Skelettmuskulatur. Die Inkorporationszeiten lagen zwischen 20 Min. bis 6 Std.:

1. In der Leber steigt die spezifische Aktivität am schnellsten im Lipidcholin an, danach folgen Glycerylphosphorylcholin, Cholin und Phosphorylcholin in dieser Reihenfolge. Daraus geht hervor, daß in der Leber die Methylgruppen über die N-Methylierung des Phosphatidyläthanolamins eingebaut werden und die Markierung von dort ausgehend in die anderen cholinhaltigen Verbindungen gelangt.

2. Die spezifische Aktivität im Cholin des Blutes liegt unter der im Cholin der Leber, ist aber höher als im Cholin der Skelettmuskulatur. Das markierte Cholin des Blutes stammt somit aus der Leber und wird vom Blut in die Muskulatur abgegeben.

3. In der Skelettmuskulatur steigt die spezifische Aktivität zuerst im Cholin an, dann folgen entsprechend dem Kennedy-Weiss-Weg Phosphorylcholin und zum Schluß Lipidcholin. Diese Befunde geben keinen Anhalt dafür, daß in der Skelettmuskulatur ebenfalls eine Bildung von Cholin durch Methylierung von freiem oder eingebautem Äthanolamin stattfindet. Die Muskulatur wird demnach auf dem Wege über das Blut mit Cholin versorgt, das aus der Nahrung stammt oder in der Leber gebildet wurde.

VI. Literaturverzeichnis

(1) G. Hevesy (1923)
"The absorption and translocation of lead by plants. A contribution to the application of the method of radioactive indicators in the investigation of the change of substance in plants"
Biochem. J. 17, 439 - 445

(2) L. Hahn u. G. Hevesy (1937)
"Formation of phosphatides in the brain tissue of adult animals"
Skand. Arch. Physiol. 77, 148 - 157

(3) C. Artom, G. Sarzana, C. Perrier, M. Santagelo u. E. Segrè (1937)
"Synthèse des phospholipides au cours de l'absorption des graisses"
Archs. int. Physiol. 45, 32 - 39

(4) J. Perlman, S. Ruben u. J. L. Chaikoff (1937)
"Radioactive phosphorus as an indicator of phospholipid metabolism. The rate of formation and destruction of phospholipids in the fasting rat"
J. biol. Chem. 122, 169 - 182

(5) H. Remmer u. J. H. Merker (1963)
"Enzym Induktion und Vermehrung von endoplasmatischem Retikulum in der Leberzelle während der Behandlung mit Phenobarbital (Luminal)"
Klin. Wochenschr. 41, 276 - 282

(6) S. Orrenius (1965)
"Further studies on the induction of the drug-hydroxylating enzyme system of liver microsomes"
J. Cell Biol. 26, 725 - 733

(7) G. Schwartzkopff, T. Schwartzkopff u. O. Pleul (1974)
"Mode of action of phenobarbital on the phosphatidylcholine metabolism of rat liver"
Pharmacology Meeting Graz 74, Graz/Austria, Sept. 2 - 5, 1974

(8) G. M. Gray u. M. G. Macfarlane (1961)
"Compositon of phospholipids of rabbit, pigeon and trout muscle and various pig tissues"
Biochem. J. 81, 480 - 488

(9) P. Bjørnstad u. J. Bremer (1966)
"In vivo studies on pathways for the biosynthesis of lecithin in the rat"
J. Lipid. Res. 7, 38 - 45

(10) E. P. Kennedy u. S. B. Weiss (1956)
"The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipids"
J. biol. Chem. 222, 193 - 214

(11) R. Sundler, G. Arvidson u. B. Akesson (1972)
"Pathways for the incorporation of choline into rat liver phosphatidylcholines in vivo"
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 35, 287 - 288

(12) J. Bremer u. D. M. Greenberg (1959)
"Mono- and dimethylethanolamine isolated from rat liver phospholipids"
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 35, 287 - 288

(13) J. Bremer u. D. M. Greenberg (1960)
"Biosynthesis of choline in vitro"
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 37, 173 - 175

(14) J. Bremer u. D. M. Greenberg (1961)
"Methyl transferring enzyme system of microsomes in the biosynthesis of lecithin (phosphatidylcholine)"
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 46, 205 - 216

(15) C. Artom u. H. B. Lofland (1960)
"Lecithin formation by methylation of intact phosphatidyldimethylethanolamine"
Biochem. biophys. Res. Commun. 3, 244 - 247

(16) K. D. Gibson, J. D. Wilson u. S. Udenfried (1961)
"The enzymatic conversion of phospholipid ethanolamine to phospholipid choline in rat liver"
J. biol. Chem. 236, 673 - 679

(17) W. E. M. Lands (1960)
"Metabolism of glycerolipids II. The enzymatic acylation of lysolecithin"
J. biol. Chem. 235, 2233 - 2237

(18) D. R. Illingworth u. O. W. Portman (1972)
"The uptake and metabolism of plasma lysophosphatidylcholine in vivo by the brain of squirrel monkeys"
Biochem. J. 130, 557 - 567

(19) G. Porcellati (1974)
"Lipid metabolism and its regulation in brain tissue"
Central Nervous System E.: E. Genazzani u. H. Herken, Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York

(20) R. R. Dils u. G. Hübscher (1961)
"Metabolism of phospholipids. III. The effect of calcium ions on the incorporation of labelled choline into ratliver microsomes"
Biochem. biophys. Acta (Amst.) 46, 505 - 513

(21) K. S. Bjerve (1973)
"The phospholipid substrates in the Ca^{2+} -stimulated incorporation of nitrogen bases into microsomal phospholipids"
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 306, 396 - 402

(22) J. Folch, M. Lees u. G. H. S. Stanley (1957)
"A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues"
J. biol. Chem. 226, 497 - 509

(23) K. Dross u. H. Kewitz (1972)
"Concentration and origin of choline in the rat brain"
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 274, 91 - 106

(24) H. Kewitz (1959)
"Nachweis von 4-Amino-n-butyrylcholin im Warmblütergehirn"
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 237, 308 - 318

(25) R. K. Crane u. F. Lipmann (1953)
"The effect of arsenate on aerobic phosphorylation"
J. biol. Chem. 201, 235 - 243

(26) E. Stahl (1967)
"Dünnschicht-Chromatografie"
Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York

(27) G. A. E. Arvidson (1968)
"Structural and metabolic heterogenity of rat liver glycerophosphatides"
European J. Biochem. 4, 478 - 486

(28) A. Klöppel, D. Post u. G. Schneider (1970)
"Abtrennung quarternärer Ammoniumverbindungen über zerlegbare Ionenpaarextrakte mit nachfolgender Identifizierung"
Fresenius Ztschr. Analyt. Chem. 252, 279 - 284

(29) G. Schill u. B. Danielsson (1959)
"Photometric determination of quaternary ammonium compounds with hexanitrodiphenylamine I"
Analyt. Chem. Acta 21, 248 - 254

(30) J. Bligh (1952)
"The level of free choline in plasma"
J. Physiol. (London) 117, 234 - 240

(31) M. Acara u. B. Rennick (1973)
"Regulation of plasma choline by the renale tubule: bidirectional transport of choline"
American Journal of Physiology 225, 1123 - 1137

(32) R. Mück
Inaugural-Dissertation (In Vorbereitung)

(33) R. J. Pennington u. M. Worsfold (1969)
"Biosynthesis of lecithin by skeletal muscle"
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 176, 774 - 782

(34) H. Kewitz, O. Pleul, K. Dross u. T. Schwartzkopff (1975)
"The Supply of Choline in Rat Brain".
Cholinergic Mechanisms, edited by P.G. Waser,
Raven Press, Publishers, New York, 1975.

(35) D. H. Treble, S. Frumkin, J. A. Balint u. D. A.
Beeler (1969)
"The entry of choline into lecithin,
in vivo, by base exchange".
Biochim biophys. Acta (Amst.) 202, 163-171

Herrn Professor Dr. med. H. Kewitz danke ich sehr herzlich für die wissenschaftliche Anleitung und die großzügige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

In gleicher Weise gilt mein Dank Herrn Dr. med. vet.
O. Pleul.

Lebenslauf

Am 5. 12. 1947 wurde ich, Thomas Schwartzkopff, als Sohn des Medizinstudenten Hartmut Schwartzkopff und seiner Ehefrau, der Medizinisch-Technischen-Assistentin Margarete Schwartzkopff, geb. Heising, in Berlin geboren. Die Schulzeit verbrachte ich in Berlin, wo ich am 13. 2. 1967 am Paul-Natorp-Gymnasium das Abitur ablegte.

Im Sommersemester 1967 begann ich an der Freien Universität Berlin Humanmedizin zu studieren und bestand dort am 9. 8. 1973 das Staatsexamen.

Seit Januar 1975 bin ich approbierter Arzt und als wissenschaftlicher Assistent im Institut für Klinische Pharmakologie im Klinikum Steglitz tätig.

B. Ladewig - Dissertationsdruck - 1 Berlin 12 - Pestalozzistraße 106
Tel.: 3128885 - 3138198